

Germoplasma de cítricos y filogenética ('Citrus germplasm and phylogenetics')

Centro de Protección Vegetal y
Biotecnología. Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA)
Carretera Moncada-Náquera, Km. 4.5,
46113. Moncada (Valencia), Spain.

Email: ancillo@ivia.es

La agricultura actual ha supuesto el abandono de las variedades tradicionales ya que esta basada en unas pocas variedades seleccionadas de alto rendimiento. Esta situación, junto con la pérdida de muchas especies silvestres que esta teniendo lugar como consecuencia de la deforestación, esta produciendo una fuerte erosión y pérdida de recursos fitogenéticos que son el fruto de miles de años de evolución y que contienen los genes o combinaciones de genes relacionados con caracteres de interés, como pueden ser la resistencia a patógenos, a condiciones ambientales adversas, la producción, la calidad y compuestos nutricionales de los frutos, etc.

Los recursos fitogenéticos son la base para la mejora genética de los cultivos y son esenciales para la adaptación a los cambios imprevisibles del medio ambiente y las necesidades humanas futuras.

El establecimiento de políticas globales para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos llevó a la FAO (que a nivel internacional, tiene una política muy activa en este campo) a la firma del Tratado Internacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el 2001. El Tratado facilita la participación en la utilización de recursos fitogenéticos a través del intercambio de información, el acceso a la tecnología y su transferencia, y la creación de capacidad. También consta de programas de ayuda destinados, sobre todo, a los

pequeños agricultores de países en desarrollo. En 2004 se creo el Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos que lidera los esfuerzos internacionales para dotar de recursos a las colecciones de material filogenético de importancia internacional. El Fondo constituye un elemento muy importante en la estrategia de financiación del Tratado, apoyando de forma específica la conservación ex situ de la diversidad genética de los cultivos. El Tratado y la Comisión contribuyen, en formas distintas pero mutuamente complementarias, a asegurar la conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos.

La **sesión** número 1 del XII Congreso Internacional de Cítricos (ICC2012), titulada "**Germoplasma de cítricos y filogenética**" se enmarca dentro de este contexto y su principal objetivo fue el de poner en común el estado actual del germoplasma de cítricos y visualizar los retos y necesidades futuras para crear estrategias globales que permita a los científicos adelantarse a ellas. En cítricos, existe una gran variabilidad genética que incluye características fenotípicas y hortícolas, resistencia a enfermedades, longitud del periodo de juvenilidad, adaptación a las condiciones del suelo o tolerancia al frío. Los frutos pueden presentar un amplio rango de variabilidad en tamaño y color, y diferentes componentes relacionados con la salud (vitaminas, carotenoides, antocianos, etc). Para poder ser utilizada, esta variación debe ser caracterizada e identificada adecuadamente, ya que esta caracterización es fundamental en cualquier estrategia de conservación y de mejora genética.

En esta sesión se presentaron un total de 18 comunicaciones procedentes de ocho países diferentes: Estados Unidos, España, Francia, China, Japón, Italia, India y Túnez. Seis de ellas fueron

seleccionadas en forma de comunicación oral tratando de incluir la mayor representatividad posible de países y utilizando como criterio la calidad e interés de los trabajos.

España y Francia mantienen desde el 2005 un acuerdo **marco de colaboración** entre el grupo de genética de cítricos del **CIRAD-INRA** de la Estación de San Giuliano en Córcega (Francia) liderado por los doctores. P. Ollitrault y F. Luro (respectivamente) y el grupo de mejora genética y sanitaria del **IVIA** (España) liderado por el prof. L. Navarro. Esta colaboración garantiza una coordinación muy estrecha entre los dos bancos de germoplasma de España y Francia, en aspectos relacionados con el **intercambio de genotipos** y el establecimiento de protocolos similares para la **caracterización morfológica y molecular** de los genotipos incluidos. El principal objetivo para este acuerdo fue el de crear un fuerte grupo de genética y mejora de cítricos en la Unión Europea que pueda ser líder en esta área a nivel internacional. Así parece demostrarlo la cantidad y calidad trabajos presentados por ambos grupos que muestran una gran actividad investigadora en el campo tanto en el marco de la colaboración como independientemente, con un total de 6 comunicaciones presentadas (2 orales y 4 posters), constituyendo un tercio del total de las comunicaciones presentadas en esta área. Entre estos trabajos se encuentra el presentado por A. García-Lor titulado "Diversidad genética y estructura poblacional del germoplasma de mandarina revelado por análisis de marcadores nucleares y mitocondriales". Este trabajo es de gran importancia ya que las *mandarinas* (*C. reticulata*) están consideradas como **una de las cuatro especies ancestrales** involucradas en el origen de todos los **cítricos cultivados**. Sin embargo, la clasificación del germoplas-

ma de mandarina es todavía muy controvertida y se sabe, o se sospecha, que existen numerosos casos de introgresión de otras especies en este germoplasma. El objetivo principal de este trabajo fue analizar la estructura de la diversidad genética de germoplasma de mandarina y su relación con las otras especies de cítricos. Para ello se genotiparon 50 marcadores microsatélites (SSR), 25 marcadores de inserción-delección (indel) nucleares y cuatro marcadores indel mitocondriales para 223 accesiones. Posteriormente se aplicó el programa informático 'Structure' para verificar y cuantificar las posibles introgresiones interespecíficas en el germoplasma de mandarina, sobre todo del genoma de pomelo y papaya. Se seleccionaron aquellos mandarinos en los que no se identificaron introgresiones y se volvió a analizar esta selección mediante el programa "Structure". Los resultados clasificaron este germoplasma en siete grupos, cinco de ellos de mandarinos básicos y otros dos en los que se incluyen genotipos de origen híbrido (conocido o supuesto). Se estimó la contribución de estos grupos a los genotipos de mandarinos. El análisis mitocondrial INDEL reveló ocho mitotipos, en cuatro de los cuales está representado el germoplasma de mandarina. Este trabajo aporta nuevos conocimientos en la organización del germoplasma de mandarina y su estructura y gracias a ello, se han podido establecer diferentes colecciones nucleares. Esto permitirá una mejor gestión y uso de las colecciones de germoplasma de cítricos y será de gran utilidad para realizar estudios de genética de asociación. La genética de asociación es aquella que busca identificar variables genéticas causales implicadas en la variación de un carácter de interés (en este caso de interés agronómico) en una población.

Dentro del mismo grupo de cooperación franco-española, otra presentación de gran interés tanto por la importancia de sus resultados como por la utilización de metodología de primera línea fue la presentada por F. Curk y titulada "Identificación de haplotipos multilocus por secuenciación paralela para descifrar la estructura interespecífica en mosaico del genoma de los cítricos cultivados". En este trabajo se parte de la base de que **los genomas** de la mayoría de los cítricos que se cultivan actualmente **son mosai-**

cos formados por grandes fragmentos de ADN procedentes de un número limitado de eventos meióticos interespecíficos. El grupo ha desarrollado una nueva metodología que permite realizar la **asignación filogenética** de esos grandes fragmentos de ADN para las principales especies cultivadas, que consiste en el diseño de primers universales para amplificar los fragmentos de ADN en dos pasos de PCR (uno que da especificidad de fragmento y otro que da la especificidad de genotipo) que posteriormente son secuenciados por la tecnología de 454 (Roche). Este método se aplicó a 192 fragmentos de DNA para la identificación de haplotipos multilocus, y a 48 genotipos de cítricos. El nivel de polimorfismo encontrado fue suficiente para diferenciar inequívocamente las especies básicas (ancestrales) y permitir la asignación del origen filogenético para cada haplotipo de las especies secundarias. Esto ha permitido sacar conclusiones muy importantes como por ejemplo, que **la naranja dulce no es un híbrido directo entre *C. reticulada* y *C. maxima* como se pensaba, sino un híbrido entre una mandarina con introgresión de *C. maxima* y un pomelo con introgresión de *C. reticulata***. La metodología puesta a punto por este grupo supone una herramienta muy poderosa para descifrar la estructura interespecífica en mosaico del genoma de los cítricos cultivados.

David Karp presentó la comunicación titulada "Germoplasma de cidro en Yunnan, China". En ella se planteó que a pesar de que el suroeste de China, noreste de India y regiones adyacentes son el centro de origen y diversidad del cidro (*Citrus medica* L.), se conoce muy poco acerca de los recursos de germoplasma de cidro en este área. Estos recursos están siendo rápidamente erosionados debido al aclarado de los bosques y al abandono del cultivo de cidro por parte de los agricultores, cambiándolo por otros cultivos más beneficiosos. En el año 2008 comenzó el **Proyecto Chino de Germoplasma de Cidro** y científicos chinos y estadounidenses viajaron por la provincia de Yunnan y sus alrededores para observar y recolectar nuevo germoplasma de cidro así como prácticas hortícolas, usos económicos, así como usos de esquejes y semillas, y todo ello se utilizó para establecer un banco de germoplasma con 30 accesiones en Jianshui, Yunnan. Algunos

de los resultados de sus observaciones son que los cidros silvestres suelen tener frutos más pequeños y cortezas más delgadas que los cultivares comerciales. Dado que la corteza es la parte económicamente más valiosa, para conservar y comer en fresco, es probable que a lo largo de los siglos, los agricultores hayan ido seleccionando este carácter en las variedades comerciales. La mayoría de los cidros sin digitaciones que crecen en Yunnan tiene albedos espesos y dulces, y no presentan vesículas de zumo. Algunos crecen hasta alcanzar incluso los 15 kg, lo que hace de ellos los cítricos mas grandes conocidos (puede observarse el tamaño de estos cidros en la figura 1, fotografía cedida por D. Karp). Los cidros digitados (Mano de Buda) se cultivan principalmente como plantas ornamentales, y se usan también en medicina tradicional china y, confitado, como alimento en cocina. Existen multitud de cultivares de cidros que varían en color de la flor, el tamaño, el grosor de los dedos, y el punto en el que los dedos se ramifican desde el cuerpo de la fruta (en la figura 2 puede verse como ejemplo uno de estos cidros en una fotografía cedida por D. Karp)

El doctor Ding Feng y su grupo del Agricultural Collage de la Universidad de Guangxi, presento la comunicación titulada "Estudio de la diversidad genética de 39 accesiones de germoplasma de cidro con marcadores Scot y ISSR", aunque en realidad los resultados que se mostraron hacían referencia a la **utilización de marcadores** moleculares para examinar la **diversidad genética** y las **relaciones filogenéticas** entre 39 accesiones no de cidros, sino de **limas y limones**. Los 18 iniciadores utilizados (9 SCoT y 9 ISSR) permitieron calcular los porcentajes de polimorfismos y dividir las 39 accesiones en seis grupos y cinco grupos (en el caso de los marcadores SCoT y ISSR respectivamente). Cabe destacar de entre sus resultados que todas las accesiones de *Citrus limonia* aparecieron en un grupo diferente a las accesiones introducidas desde Europa y América. Otra conclusión importante de este trabajo fue que aunque ambos tipos de marcadores pudieron discriminar grupos entre si (como las limas y los limones), el análisis con los marcadores SCoT da mucha mayor información y es mas útil en la identificación de cultivares muy próximos.

Sigue en pag. 14 y 16 ►



Figura 1. Puesto de venta de cidros a pie de carretera en Yunnan (China) (Fotografía cedida por D. Karp).

Figura 2. Cidro (mano de Buda) sin pulpa ni semillas recolectado por D. Karp en Yunnan (China) (Fotografía cedida por D. Karp).

Figura 3. Ejemplo de diversidad del Banco de Germplasma del INRA-CIRAD de la Estación de San Giuliano en Córcega (Francia). (Fotografía cedida por F. Curk)

Figura 4. Parcelas y ejemplares de la colección de campo del Banco de Germoplasma del IVIA. (Fotografía cedida por C. Navarro)

Figura 5. En los recintos de malla anti-pulgón las plantas se mantienen en contenedores de 70 cm de diámetro con fertirrigación automatizada.



El grupo del doctor T. Shimizu del NARO Institute of Fruit Tree Science de Japon presentó un estudio sobre el **origen de las variedades enanas y sin espinas de naranjas trifoliadas** deducido del análisis de genotipado a nivel genómico. El *Poncirus trifoliata* L. es comúnmente utilizado en Japón como patrón. Disponen de varias variedades que difieren en cuanto a la altura o morfología del árbol pero no se conoce nada acerca de su origen filogenético. Con el fin de profundizar en ello este grupo realizó una comparación de tres variedades, una naranja trifoliada que carece de espinas en la axila de la hoja y dos naranjas trifoliadas enanas. El genotipado se realizó con 289 marcadores SSR repartidos a lo largo de todo el genoma y las conclusiones que se pudieron extraer del análisis fueron que una de las naranjas enanas, la variedad "Hiryu" (Flying dragon), es una mutación espontánea de la accesión de *Poncirus trifoliata* que existe en su colección, mientras que la otra variedad enana, la "Unryu" se ha originado por autopolinización y mutación en un locus determinado.

Las semillas de cítricos pierden rápidamente la viabilidad y la mayoría de ellas son sensibles a la desecación, por lo que no existen métodos que aseguren su conservación. Las colecciones de plantas cultivadas en recintos de malla tiene riesgo de pérdida de genotipos (especialmente sensibles a las bajas temperaturas) y las de campo son vulnerables a los daños causados por enfermedades, plagas, climatologías adversas o desastres naturales. La **crioconservación** es una alternativa segura que permite garantizar la conservación a largo plazo y que permitiría disminuir el número de plantas vivas que se mantienen de cada genotipo en campo o recinto de malla, lo que permitiría una reducción a medio/largo plazo de los costos de mantenimiento de los bancos de germoplasma, sin perder ninguna ventaja. Los protocolos que en la actualidad se están utilizando para la crioconservación de genotipos consisten en llevar tejidos y células vegetales a condiciones tales que la división celular y el metabolismo se encuentren totalmente parados y se puedan conservar a temperaturas muy bajas (generalmente nitrógeno líquido a -196°C). Es lo que se denomina un **callo embriogénico**. Esta forma de **mante-**

ner el germoplasma mantiene todas las ventajas de las colecciones de campo o de malla pues los callos embriogénicos crioconservados pueden utilizarse directamente para la mejora de los cítricos mediante técnicas de fusión de protoplastos y de transformación genética, es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética del material y reduce sustancialmente el esfuerzo y los costes que representan el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* o *in vitro*, al eliminar casi por completo la mano de obra y evitar los riesgos fitopatológicos y fisiológicos que habitualmente aparecen. Aun y así es una metodología que requiere mano de obra especializada, que requiere de entrenamiento y no todos los bancos de germoplasma de cítricos la han implementado. En este contexto, el United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS) representado por la doctora G.M.Volk, presentó los últimos avances en "Crioconservación de cítricos para su conservación a largo plazo" que está llevando a cabo su grupo. El método que ellos están tratando de poner a punto, parte de yemas cortadas directamente de la planta fuente en el campo o en el recinto de malla. Posteriormente se esteriliza la superficie de las yemas y se tratan con crioprotectores que las desecan y les permiten sobrevivir a la exposición al nitrógeno líquido. De esta manera, las plantas pueden ser recuperadas por microinjerto dejando descongelar la yema en una plántula de "carrizo" usada como patrón. Las ventajas que presenta este nuevo método es que no hay reversión de las plantas al estado juvenil por lo que es más rápido regenerar plantas (algunos genotipos florecen a los 13-15 meses tras la crioexposición). Las desventajas son, en primer lugar, su baja eficiencia de recuperación (50% frente al 100% obtenido con el método de callos embriogénicos que se usa por ejemplo en el IVIA), y en segundo lugar, que si bien puede ser utilizado ampliamente para conservación de material sano, en el caso de material infectado solo es aplicable en aquellos casos en la enfermedad pueda ser erradicada por técnicas de crioterapia.

También dentro de la temática de la sesión se organizó el **Workshop "Estrategia global de conservación para los**

recursos genéticos de cítricos". Existen colecciones de germoplasma de cítricos de mayor o menor extensión en multitud de países del mundo: España, Francia, Estados Unidos, China, Brasil, Australia, Italia, Japón, Israel, Sudáfrica, Tailandia, Marruecos, Vietnam, Argentina, Uruguay, Argelia, Turquía, y algunas otras de menor importancia. El objetivo principal de este workshop era tratar de organizar una estrategia global para la conservación del germoplasma de cítricos según se había especificado en el International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (ITPGR) y surge de la necesidad de realizar una revisión del germoplasma existente a nivel internacional. Para ello se ha propuesto realizar una encuesta a todos los bancos de germoplasma de cítricos del mundo que quieran participar en esta iniciativa con el, quizá, objetivo último de unificar toda la información en una base de datos conjunta que pueda estar disponible públicamente. Esto a su vez permitirá, entre otras múltiples cuestiones, tener una visión global de cuanto están afectando enfermedades y plagas, también actualizar los protocolos para el movimiento seguro de germoplasma entre diferentes países, etc. Un breve resumen del contenido del taller es la siguiente:

1) Discusión de la encuesta a realizar para resumir información institucional de las colecciones, diversidad *in situ*, formas de conservación, instalaciones, efecto de las plagas y enfermedades en la recogida, tipos de datos recogidos, almacenamiento de datos y métodos de gestión, distribución, seguridad a largo plazo de las colecciones, costos anuales, procedencia de los fondos, etc

2) Establecimiento de grupos de trabajo para desarrollar o actualizar los protocolos para el movimiento seguro del germoplasma.

3) Discusión de estrategias alternativas de conservación (criogenia, cultivo de tejidos).

4) Estrategias para conseguir el apoyo de la industria para la conservación de germoplasma.

Los países con las colecciones más importantes a nivel internacional presentaron sus bancos de germoplasma y sus modelos de gestión al resto de la comunidad científica a través de sus máximos responsables. China es uno de los países más importantes no solo por sus colecciones *ex situ*, si no por la gran cantidad de germoplasma *in situ* que posee. No hay que olvidar que es un centro de origen y diversificación de germoplasma de cítricos y debido a ello cuentan con una riqueza incalculable. El profesor Xiung Deng presentó el Banco de Germoplasma de la Universidad de Wuhan (China) que, junto con el del Citrus Research Institute de Chaongqing son los más importantes a nivel nacional. Estados Unidos posee dos bancos de germoplasma uno en Florida y otro en Riverside (California) de mayor importancia y en mejor estado de conservación. Tracy Khan presentó el banco de germoplasma de la Universidad de California, una de los mejor caracterizados del mundo con más de 1.000 accesiones. El doctor Marcos Machado presentó la colección del Centro de Citricultura Sylvio Moreira de Cordeiropolis (Sao Paulo) con más de 2.000 accesiones. El doctor Francois Luro del INRA presentó el banco de germoplasma del INRA-CIRAD de la Estación de San Giuliano en Córcega (Francia, figura 3)* que consta de 1.111 accesiones y que junto con el español es el más importante de Europa. La doctora Shara Ashmore presentó la colección australiana focalizando la atención de la comunidad científica en el peligro de la pérdida de algunas especies silvestres endémicas australianas de gran interés (principalmente del género *Microcitrus* y *Eremocitrus*) debido a la falta de soporte económico que está sufriendo en su país el área de los recursos fitogenéticos. Y, finalmente el Banco de Germoplasma de cítricos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias fue presentado por la doctora Gema Ancillo. Dicho banco se inició en 1975 y su objetivo principal fue, y es, el mantenimiento de genotipos que incluyan la mayor variabilidad genética posible en el género *Citrus* y los géneros afines de la subfamilia Aurantioideae. Tiene como características fundamentales, en primer lugar, que todos los genotipos se someten a un proceso de saneamiento y sólo se man-

tienen genotipos libres de patógenos transmisibles por injerto y, en segundo lugar, que gracias al minucioso y continuado proceso de evaluación y caracterización de genotipos que se llevan a cabo de manera rutinaria y sistemática en el banco, no existen genotipos duplicados en la colección española, por ello el número de accesiones es menor que el de otros bancos de germoplasma de cítricos en los que si que existen duplicaciones (algunos bancos mantienen varias accesiones de un mismo genotipo). El banco del IVIA consta de 620 genotipos (330 seleccionados en España y 290 introducidos del exterior a través de la estación de cuarentena). Incluye 425 genotipos de 51 especies del género *Citrus*, 53 genotipos de 44 especies de 20 géneros afines de los cítricos y 142 híbridos intra e interespecíficos. Consta de 3 colecciones: La de campo en la que se realiza la evaluación y caracterización de los genotipos (en la figura 4 pueden verse unas parcelas y ejemplares de la colección, fotos cedidas por C. Navarro). La de recinto de malla anti-pulgón para mantener el material sano y evitar la recontaminación y las pérdidas debidas a estreses abióticos (puede verse un ejemplo en la figura 5) y la colección de callos embriogénicos crioconservados que cuenta con 60 genotipos.

El intercambio de material de cítricos entre diferentes países constituye un riesgo elevado de introducción de nuevas plagas y enfermedades que en algunos casos pueden tener efectos devastadores. Por ello existe la necesidad de revisar y actualizar los diferentes protocolos para el movimiento del germoplasma que existen en los diferentes países. A este respecto el modelo español es una referencia internacional ya que posee el mejor Programa de Saneamiento a nivel mundial. En España la totalidad del material propagado por los viveros es material sano que parte del Banco de Germoplasma. La Dra. M^a Carmen Vives del IVIA, presentó el protocolo español utilizado dentro del Programa de Saneamiento, explicando dentro de él, la aplicación de la técnica de microinjerto en ápices caulinares a la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas y puso de manifiesto que la importación de material a través

de las estaciones de cuarentena minimizan los riesgos de la importación de material de otros países.

Como **conclusión** de esta reunión de representantes de los diferentes países en el área del germoplasma y la filogenia de los cítricos, podríamos decir que **existe la conciencia internacional de que a diversidad fitogenética incrementa las opciones y proporciona un seguro contra futuras condiciones adversas**, como por ejemplo los entornos extremos y variables. Sin embargo no solo es **fundamental conservar la diversidad fitogenética, también lo es la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos**. La comunidad científica tiene la capacidad de mejorar variedades y patrones utilizando la extensa fuente de recursos fitogenéticos con que cuentan los cítricos, pero antes, esta variabilidad genética debe ser caracterizada e identificada adecuadamente, ya que esta **caracterización es fundamental en cualquier estrategia de conservación y de mejora genética**. En el futuro necesitaremos de un enfoque global e integrado en forma de redes o asociaciones, que reúna internacionalmente a todas las partes implicadas, desde agricultores hasta los gestores de los bancos de genes, pasando por los investigadores para desarrollar mecanismos que permitan a los sistemas de cultivo adaptarse a los cambios, como por ejemplo el climático, y satisfacer las nuevas necesidades que irán surgiendo.

*Fotografía cedida por F. Curk